Aus dem

Robert Koch-Institut

Berlin

(Direktor:Prof.Dr.G.Henneberg)

Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung

(Leiter: Prof.Dr. H.Raettig)

Über die Lebenszeit von Salmonella-Bakterien in Warmwasser-Fischen

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

John, Rolf-Dieter

aus Berlin

1965

Aus dem

Robert Koch-Institut

Berlin

(Direktor:Prof.Dr.G.Henneberg)

Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung

(Leiter: Prof.Dr. H.Raettig)

Über die Lebenszeit von Salmonella-Bakterien in Warmwasser-Fischen

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

John, Rolf-Dieter

aus Berlin

Dekan: Professor Dr. med. Adalbert Loeschke

Referent: Professor Dr. med. Hansjürgen Raettig

Korreferent: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 24. September 1965

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Zu der Gruppe der Salmonella-Bakterien gehören die Erreger des Typhus abdominalis,des Paratyphus A,B und C sowie eine große Anzahl von Enteritiserregern,die bei Mensch und Tier vorkommen.Die ersten rufen beim Menschen zyklische Allgemeininfektionen (HÖRING) hervor,während die Enteritiserreger lokale Entzündungen des Darmes verursachen.Nach Infektionen mit Enteritiserregern kommt es nur selten zu einem Dauerausscheidertum,während im Gegensatz dazu Typhus- und Paratyphusinfektionen jahrelanges,oft auch lebenslängliches Dauerausscheidertum bewirken können.

Die Keime dieser Bakteriengruppe sind pathogen für Mensch und Tier;einige besitzen allerdings eine spezifisch angepaßte Pathogenität,wie z.B. Salmonella typhi für den Menschen oder Salmonella abortus-equi,Salmonella abortus-ovis,Salmonella gallinarum-pullorum u.a. für bestimmte Tiere.

Die Erreger sind gramnegative Stäbchen,wachsen auf den gebräuchlichen Nährböden aerob,bilden keine Sporen und sind meistens peritrisch begeißelt.Sie lassen sich daher von anderen,ihnen nahestehenden gramnegativen Stäbchen morphologisch nicht unterscheiden.Ihr Temperaturoptimum liegt bei 37'C.

Mit Hilfe biochemischer Methoden,der sog.Bunten Reihe,in der die Fermentationsfähigkeit der Bakterien für verschiedene Kohlenhydrate und

Alkohole und u.a. der Eiweißabbau,Indolbildung, Gelatineverflüssigung,Schwefelwasserstoffbildung,Harnstoffspaltung,das Reduktionsvermögen usw. geprüft werden,gelingt es,die Salmonella-Bakterien von anderen Bakteriengruppen,besonders von den übrigen Enterobakteriaceae zu unterscheiden.

Daneben besteht als wichtigste Identifizierungsmöglichkeit die Agglutination der Salmonella-Bakterien mit spezifischem agglutinierenden Serum,da die Salmonellen O-Antigene (Körperantigene) und als bewegliche,begeißelte Bakterien auch H-Antigene (Geißelantigene) besitzen.

Durch die Bestimmung der verschiedenen O- und H-Antigene läßt sich ein Salmonella-Stamm in das diagnostische Schema der Salmonella-Gruppe,das sog. KAUFFMANN-WHITE-Schema,einordnen.Mit dieser Methode können z.Zt. über 800 Salmonella-Serotypen bestimmt werden.

Bei einigen Salmonella-Typen sind noch andere Antigene vorhanden,wie z.B. das Vi-Antigen bei Typhus und Paratyphus C-Stämmen oder das Schleimantigen (M) bei manchen schleimig wachsenden Stämmen.

Wie viele Bakterien können auch die Salmonellen von der durch spezifische agglutinierende Seren agglutinablen Glatt-Form (S=smooth-Form) in die Rauh-Form (r=rough-Form) umschlagen.Sie agglutinieren dann spontan in 0,9% iger und 3,5% iger Kochsalzlösung,so daß die serologische Bestimmung

erschwert ist oder sogar unmöglich wird.

Daneben kann man verschiedene Salmonella-Typen noch mit Hilfe spezifischer Bakteriophagen weiterdifferenzieren:Lysotypie.

Der Leib der Salmonella-Bakterien besteht aus verschiedenen chemischen Substanzen, von denen hier nur drei erwähnt werden sollen, da sie zu dem Endotoxinkomplex gehören,und zwar die Polysaccharid-,die Lipid- und die Eiweißkomponente.Die serologische Spezifität ist in der Polysaccharid-Komponente verankert,die Lipide bewirken die Toxizität,und das Eiweiß bestimmt die Antigenität.
Vor Austrocknung und Belichtung geschützt sind die Salmonellen lange lebensfähig.In Nahrungsmitteln überstehen sie Einfrieren und Tiefkühlung. Temperaturen von +55'C für 1 h oder +60'C für 1/2 h töten sie ab,doch sind sie unter günstigen Bedingungen lange lebens-und vermehrungsfähig.

Auf die durch Salmonellen hervorgerufenen Krankheitsbilder Typhus,Paratyphus A, B und C soll hier nicht näher eingegangen werden. Die Enteritiserreger verursachen,wie der Name sagt,eine akute Gastroenteritis mit Unwohlsein, Erbrechen,Kopfschmerzen und Durchfällen.Die Körpertemperatur kann auf 39-40'C ansteigen, sinkt aber oft bereits nach wenigen Stunden, meist aber am 2. oder 3. Tag.Leichtere Verlaufsformen gehen nur mit leichtem Unwohlsein und

etwas dünnen Stühlen einher.
Bei der Aufnahme großer Toxinmengen kann die Infektion aber auch in den ersten 24 h durch Kreislaufschwäche ad exitum führen;letzteres ist besonders bei Kindern,Greisen und geschwächten Personen zu befürchten.
Bestimmte Salmonella-Typen,bes. S.cholerae-suis verursachen beim Menschen häufiger septische Krankheitsbilder mit metastatischen Lokalinfektionen (Abszesse,Empyem,Osteomyelitis usw.), worauf schon BOECKER hinwies.

Als Reservoir für die Salmonellen kommen vor allem in Frage:

1. Der Mensch als Keimträger bzw. Dauerausscheider und fäkale Verunreinigungen durch infiziertes Abwasser.
2. Tiere bzw.alle Nahrungsmittel,die aus infizierten Tierprodukten hergestellt wurden.

Insbesondere kann es in und auf Lebensmitteln noch zu einer Vermehrung der Erreger und damit bei Verzehr zur Aufnahme großer Toxinmengen kommen.Besonders verhängnisvoll ist es,daß die Salmonella-infizierten Lebensmittel weder unangenehm zu riechen,noch im Geschmack beeinträchtigt zu sein brauchen.Selbst wenn beim Bereiten dieser Lebensmittel Temperaturen erreicht werden,die die Keime abtöten,können

sich dennoch Krankheitssymptome zeigen,denn auch die Leibessubstanzen der bereits abgetöteten Bakterien sind als Toxin wirksam.Das Endotoxin ist weitgehend hitzestabil, da es aus Fettsäuren besteht,die esterartig an Polysaccharid gebunden sind.

Das in den letzten Jahrzehnten in Deutschland wie auch in anderen europäischen Ländern (3) häufige Bekanntwerden von Infektionen durch Bakterien der Salmonella-Gruppe ist sicher z.T. auf verbesserte Möglichkeiten der Diagnostik, zum anderen aber besonders auf eine echte Zunahme der Infektionen zurückzuführen.-Auch früher waren in Deutschland Salmonellosen bekannt,doch war die Zahl der Infektionen weit geringer als heute;man faßte sie unter dem Begriff der bakteriellen Lebensmittelvergiftung zusammen.Die Hauptvertreter der Erreger der bakteriellen Lebensmittelvergiftung im Sinne der Seuchengesetzgebung sind S. typhi-murium und S. enteritidis.Von den zur TPE-Gruppe gehörenden spezifischen Erregern der bakteriellen Lebensmittelvergiftung sind Clostridium botulinum, der Erreger der eigentlichen Fleisch- und Wurstvergiftung,wie auch zahlreiche saprophytäre Keime,wie Proteusbakterien und Staphylokokken u.a. abzugrenzen,die bei Wuchern auf Lebensmitteln ebenfalls zu Intoxikationen führen können.

Über Salmonellabefunde in frischen Hühnereiern, bzw. in aus Hühnereiern hergestellten Waren berichten u.a. VOR DEM ESCHE und HANDLOSER (5). Sie beschreiben zwei Epidemien, bei denen nach negativen Untersuchungsergebnissen von allen übrigen Backzutaten und dem mit der Herstellung beschäftigten Personal aus mehreren Brutanstalten zusammengekaufte Bruteier sowie zu einem geringen Prozentsatz verwendete dänische Importeier als Quelle für die Infektion der Backware mit S.typhi-murium angesehen werden.

Weit häufiger sind Berichte über Salmonellafunde in Eipulvern,Trockenei,Eiklar,Kristallei und anderen Produkten aus China,Jugoslavien, Holland, den USA und anderen Ländern.

Die Salmonellainfektion der Eier bei Enten ist schon lange bekannt.Offenbar kann es zu einer intraovariellen Infektion der Eier kommen,was für den Menschen besonders gefährlich ist,da die Keime im Eiinneren das Kochen relativ gut überleben. (Diese Tatsache führte 1936 zu der Verordnung,Enteneier 8 Minuten zu kochen.Im Jahre 1954 wurde in einer weiteren Verordnung die vorgeschriebene Kochzeit von 8 auf 10 Minuten erhöht.)

ROHDE und ADAM (15) berichten über die Einfuhr chinesischen Trockeneies über Hamburg in das Bundesgebiet,dessen Annahme wegen des hohen Salmonellagehaltes in England verweigert worden

war.Aus 12 Proben davon konnten die Autoren 9x Salmonellen nachweisen.
FROMME (7) weist darauf hin,daß Trockeneiprodukte wahrscheinlich zum größten Teil aus Enteneiern gewonnen werden und beschreibt dann u.a.die Herstellung von Trockenei in China durch Ausstreichen von Eigelb auf Leinwand und Trocknen in der Sonne.-Dieser Prozeß läßt andere Infektionsmöglichkeiten als die intraovarielle erkennen.
Die Berichte und Funde von Salmonellen in Eiprodukten führten dann schließlich zum Erlaß der "Verordnung zum Schutze gegen Infektionen durch Erreger der Salmonella-Gruppe in Eiprodukten" (25) von 1956,in der es verboten wird, Eiprodukte zum Verkauf vorrätig zu halten,feilzuhalten,zu verkaufen oder sonst in den Verkehr zu bringen,die nicht in der Weise ausreichend vorbehandelt wurden,daß die Erreger der Salmonella-Gruppe und die anderen Erreger der Gruppe der Enterobakteriaceen abgetötet werden konnten.

Von KAUKER (10) wurde aus einem Brathühnchen,nach dessen Genuß zwei Personen an akuter Gastroenteritis mit Somnolenz,Fieber und Schwäche erkrankten,S.infantis isoliert.

BISCHHOFF (2) berichtet über die Erkrankung einer siebenköpfigen Familie an heftiger Enteritis nach dem Genuß von Schweinefleisch.Es handelte sich um Fleischteile eines tauglich abgestempelten,hausgeschlachteten

Schweines,bei dem weder in lebendem Zustand Krankheitszeichen,noch nach der Schlachtung Verdächtiges aufgefallen war.Von dem rohen Fleisch konnten Salmonella-Keime vom Typ S.braenderup gezüchtet werden.Auch in Stuhlproben der Erkrankten wurde S.braenderup gefunden.Da zu dieser Zeit eben dieser Salmonella-Typ 5x aus Fischmehl isoliert wurde,nimmt BISCHHOFF an,daß dieser Futterstoff die Ursache der Infektion war.Genau konnte es allerdings nicht bewiesen werden,da von der Partie Fischmehl,mit der das Schwein gefüttert worden war,nichts mehr vorhanden war.

1955 erkrankte in Brackwede bei Bielefeld ein großer Teil der Bevölkerung an enteritischen Erscheinungen.Bei 560 Personen wurde S.blockley nachgewiesen,ein Typ,der bis dahin in Deutschland nicht bekannt war und erst kurz vorher einmal in ausländischem Fischmehl (aus Angola) nachgewiesen wurde.-Die Infektionsquelle in Brackwede fanden REPLOH und RAINER (14) in einer Wurstsorte (grobe Braunschweiger Wurst), die aus Schweinefleisch hergestellt wurde.(In Amerika wurde in einem ähnlichen Fall etwa zur gleichen Zeit derselbe Salmonella-Typ wie in Brackwede gefunden und daher S.blockley genannt).

Für das Zustandekommen der Infektion der Tiere bestehen theoretisch folgende Möglichkeiten:

1. Infektion der Tiere auf der Weide,bzw. bei Geflügel auf den Teichen und Gewässern.
2. Infektion der Tiere durch menschliche Bakterienausscheider in demselben Gehöft.
3. Infektion der Tiere durch Futtermittel.

Zu 1 Hier muß auf den Bericht von SCHMIDT und LENK (19) hingewiesen werden,in dem über das Vorhandensein von Salmonellen verschiedener Typen in verschiedenen Abschnitten des Abwassersystems von Berlin nach dem Einlauf in das Absetzbecken,nach biologischer Reinigung und vor dem Einlauf in den Vorfluter,in diesem Fall die Havel bei Gatow,berichtet wird und beschrieben wird,daß in 5 Entnahmen von Wasserproben 50 m oberhalb bis 600 m unterhalb der Einmündungsstelle des Abwassergrabens in die Havel 17x Salmonellen isoliert werden konnten.-Diese Verseuchung kann einmal zur Gefahr für badende Menschen werden,die jedoch durch starke Chlorung des Vorfluters während der Sommermonate vermindert werden soll. Wenn auch nach STEINIGER (23) die Gefahr der Infektion beim Baden in salmonellaverseuchtem Wasser nicht überschätzt werden soll,so weisen doch SCHMIDT und LENK (19) darauf hin,daß es nicht unmöglich ist,daß immer wieder sporadisch auftretende Enteritiserkrankungen durch Baden in solchen Gewässern zustande kommen können.

Daneben wäre es durchaus denkbar, wenn in Gegenden, wo Viehweideflächen an den Vorfluter in dem betreffenden Abschnitt oder gar an den Einmündungsgraben grenzen, gerade im Frühjahr, wo bekanntlich die Überschwemmungsgefahr besonders groß ist, diese Weideflächen überschwemmt und infiziert werden und so zu einer Infektionsquelle für das Weidevieh werden.
In diesem Zusammenhang soll auch auf die Infektionsmöglichkeit von Weideplätzen durch Zug- und Strichvögel, besonders durch Möven, hingewiesen werden.
Bei der Besichtigung der Kläranlage von Hannover fiel PETZELT und STEINIGER (13) auf, daß Vögel vor allem in Frostzeiten eifrig von dem Rechengut, insbesondere von dem von der Oberfläche abgenommenen Fett fraßen. Durch Untersuchungen der Autoren wurden in Kotproben verschiedener Vogelarten (Buchfink, Haussperling, Lachmöve, Star, Schwarzdrosseln) eine Reihe von Salmonella-Typen nachgewiesen: S.bareilly, S.braenderup, S.dublin, S.enteritidis, S.heidelberg, S.infantis, S.java, S.london, S.montevideo, S.newington u.a., auch S.paratyphi A und B, S.typhi und S.typhi-murium. Der exakte Nachweis, daß sich die Vögel bei ihrem Aufenthalt an der Kläranlage durch Nahrungsaufnahme aus derselben infiziert haben, ist nicht leicht zu führen. Man müßte dazu Kotproben derselben Vögel vor und nach ihrem Aufenthalt an

der Kläranlage untersuchen,da ja die Tiere schon vor dem Salmonella-Träger gewesen sein könnten. Die engen qualitativen und quantitativen Beziehungen der bakteriellen Untersuchungsbefunde des Materials aus der Kläranlage und den Kotproben der Vögel veranlassen jedoch die Autoren zu dem Schluß,daß die Annahme der Infektion der Tiere durch Nahrungsaufnahme aus der Kläranlage weitgehend gerechtfertigt ist.Es wird weiter gefolgert, daß durch die Vögel,die sich zeitweise von solchen Materialien ernähren,eine Streuung der Salmonellen je nach Art und Menge der aufgenommenen Keime z.B. durch Kotausscheidung mit Sicherheit möglich ist.

Eine weitere Untersuchung von STEINIGER (22) galt der Verfolgung der Frage,ob es sich bei den Vögeln um passagere oder um Dauerausscheider handelt.Die Untersuchungen wurden an Möven durchgeführt und auf die weit von den Winterquartieren entfernten Brutkolonien,die Vogelinseln Stora und Karlsö bei Gotland,ausgedehnt.So konnte ein fluktuierender Verkehr der Vögel zu den verseuchten Häfen ausgeschlossen werden.-In den gesammelten Vogeldejekten konnten S.typhi,S.paratyphi B und S.panama nachgewiesen werden,in einigen Fällen sogar auf der Schale der Eier der Möven.

Welche Gefahr diese Vögel nun als Infektionsquelle für andere Tiere,besonders für die Weidetiere bedeuten,ist schwer zu sagen.Die Frage muß hier dahingestellt bleiben.

Zu 2 Die Infektion der Tiere durch menschliche Bekterienausscheider in demselben Gehöft scheint selten zu sein,doch wird von MESSERLI (12) ein solcher Fall berichtet. Es erkrankten der Bauer,die Hausfrau und drei Kälber auf demselben Hof an fieberhaftem Durchfall.Bei dem Bauern,der Hausfrau und zwei weiteren Personen auf dem Gehöft wurde S.typhimurium nachgewiesen.Bei zwei verendeten und sezierten Kälbern fanden sich in allen Organen und Darmabschnitten Salmonella typhi-murium. Das dritte Kalb genaß nach Chloramphenicolgaben. MESSERLI vermutet die Übertragung der Salmonellen vom Menschen auf das Tier,da vier der auf dem Hofe lebenden fünf Personen mit den Fäces S.typhimurium ausschieden,während die Untersuchungen von Kotproben des gesamten Rinderbestandes dieses Gehöftes negative Ergebnisse zeigten.

Zu 3 Eine Infektion der Tiere durch die Futtermittel ist heute für eine große Zahl von Tierarten durch den Zusatz von sog.Kraftfutter zu den herkömmlichen Futtermitteln durchaus möglich. In besonders hohem Maße werden diese Zusatzfuttermittelfür Schweine und Geflügel verwendet,ja man kann wohl sagen,daß heute kaum noch ein Schwein an den Schlachthof geliefert wird,das nicht zu irgend einer Zeit damit gefüttert wurde. - Diese Kraftfutter bestehen neben Knochenmehl,Dörrfleisch und Fleischmehl zum größten Teil aus Fisch-

mehlen verschiedenster Herkunft.Dieses Fischmehl stellt einen Nahrungsstoff mit besonders hohem und wertvollem Eiweißgehalt bei geringem Preis dar.Es ist daher erklärlich,daß es zur Fütterung und Aufzucht von Tieren ein beliebter und heute kaum mehr zu entbehrender Rohstoff ist.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Weltproduktion von Fischmehl und Fischöl. Angaben aus dem statistischen Jahrbuch der UN 1961/Abteilung 71 (Mengenangaben in 1000 t)(24).

Jahr	1948	1952	1953	1954	1955
Land					
Angola	11,3	28,5	41,9	53,0	52,5
Belgien	0,7	0,8	6,0	6,6	6,0
Kanada	41,6	45,4	46,8	58,9	57,4
Chile	0,8	8,5	7,5	7,4	15,6
Dänemark	10,8	22,1	28,1	35,6	48,2
Deutschland	16,6	62,6	70,1	69,9	83,9
Island	41,2	23,3	26,0	35,4	35,0
Japan	34,3	95,3	95,6	103,7	141,6
Marokko	-	13,4	16,4	10,1	8,0
Niederlande	4,8	10,0	9,5	10,8	9,7
Norwegen	125,5	198,6	161,3	249,3	198,8
Peru	-	9,2	12,1	16,5	20,1
Südafrika	10,7	43,1	57,9	41,4	46,8
Südwestafrika	-	36,0	58,2	51,2	48,8
Spanien	-	4,2	5,1	5,6	6,1
Schweden	4,2	5,7	6,7	6,5	6,0
UdSSR	10,9	20,0	24,4	30,4	36,0
Großbritannien	60,1	79,2	84,4	83,4	90,4
USA	195,5	264,4	290,5	337,6	340,6

Jahr	1956	1957	1958	1959	1960
Land					
Angola	77,7	85,2	47,8	46,2	44,0
Belgien	6,0	6,0	6,0	6,0	4,5
Kanada	76,2	51,2	65,6	70,4	38,8
Chile	13,0	16,6	18,3	30,0	42,3
Dänemark	46,9	54,9	65,6	70,8	50,6
Deutschland	76,3	78,7	76,6	91,6	82,9
Island	39,5	44,6	44,0	69,4	54,6
Japan	131,4	155,4	213,3	256,8	312,7
Marokko	5,9	12,6	20,7	15,1	8,2
Niederland	7,5	9,1	9,6	15,7	7,7
Norwegen	264,0	191,3	117,9	133,9	158,2
Peru	31,0	64,5	126,9	332,4	558,3
Südafrika	35,3	48,1	57,3	75,0	98,0
Südwestafrika	46,3	43,9	42,8	61,9	5 60
Spanien	7,9	8,1	11,6	17,2	-
Schweden	5,2	6,3	6,4	7,9	-
UdSSR	46,2	40,6	43,9	62,8	85,1
Großbritannien	86,1	81,5	78,2	80,4	76,2
USA	385,2	349,4	341,5	426,4	351,3

Aus diesen Fischmehlen isolierten BISCHHOFF, ROHDE, ADAM, SEELIGER und andere bei einer großen Anzahl von Untersuchungen die verschiedensten Salmonellatypen. Insgesamt wurden von ROHDE und BISCHHOFF bis 1956 270 Fischmehl-, 2 Walmehl- und 3 Fleischmehlproben untersucht. In 43 Proben, das sind 15,6%, wurde dabei die Infektion des

Futtermittels durch Salmonellen nachgewiesen. Das Bild, das sich danach aus der Verteilung der Befunde auf die einzelnen Exportländer ergab, sieht folgendermaßen aus (nach ROHDE und BISCHHOFF (16):

S. schwarzengrund	2x aus Fischmehl aus Angola
S. typhi-murium	1x aus Fischmehl aus Angola
S. braenderup	1x aus Fischmehl aus Angola
	1x aus Fischmehl unbek. Herkunft
S. montevideo	1x aus Walmehl aus Chile
S. infantis	1x aus Fischmehl unbek. Herkunft
S. tennessee	1x aus Fischmehl aus USA
S. muenchen	1x aus Fischmehl aus Angola
S. blockley	1x aus Fischmehl aus Angola
S. kentucky	1x aus Fischmehl unbek. Herkunft
S. anatum	3x aus Fischmehl unbek. Herkunft
S. amager	2x aus Fischmehl aus Angola
	1x aus Fischmehl aus Portugal
	5x aus Mischmehlen
S. orion	8x aus Mischmehlen
S. goerlitz	1x aus Fischmehl aus Portugal
S. newington	3x aus Mischmehlen
	1x aus Fischmehl aus Frankreich
S. binza	3x aus Fischmehl aus Angola
	1x aus Mischmehl
S. senftenberg	1x aus Fischmehl aus Norwegen
	1x aus Fischmehl aus Argentinien
S. taksony	1x aus Mischmehl
S. simsburg	1x aus Fischmehl aus USA

S.17:a:1,5	1x aus Mischmehl
S.kirkee	1x aus Trockenfischen aus der Südsee
S.cerro	1x aus Mischmehl
S.minnesota	1x aus Mischmehl
	1x aus Fischmehl aus Angola

Aus den Jahresberichten über die Salmonellosen in Deutschland 1957 (20) und 1958 (21) ergibt sich für 1957 eine Gesamtzahl von 3553 Isolierungen von Salmonella-Stämmen (bei einer Einfuhr von über 100 000 t Futtermitteln),die sich auf 62 Salmonella-Serotypen verteilt, während 1958 die Zahl der verschiedenen Serotypen auf 74 anstieg.
Auch im Jahresbericht über die Salmonellosen in Deutschland 1959 (9) wird wieder über Salmonellabefunde in Lebens- und Futtermitteln berichtet. Dabei wurden 78 Salmonella-Spezies isoliert.Die Anzahl der Erstisolierungen ist seit 1958 von 705 auf 518 zurückgegangen.Aus importierten Futtermitteln,wie z.B. Knochenmehl,Knochenschrot und Fischmehl wurden meist die sog. seltenen Serotypen isoliert,während in Fleischwaren,Eiern und anderen Lebensmitteln vorwiegend die endemischen Typen gefunden wurden.
Aus der Tabelle von ROHDE und BISCHHOFF (16) ist ersichtlich,daß infiziertes Fischmehl meist aus tropischen Ländern eingeführt wurde.
Offenbar muß das heute häufigere Auffinden von

Salmonella-Bakterien im Fischmehl mit der Wahl der Importländer in einem Zusammenhang stehen, denn Fischmehl war auch schon in den Jahren vor dem 2.Weltkrieg ein Hauptbestandteil der Futtermittel.Während jedoch vor 1945 vorwiegend nordische Länder wie Norwegen,Island,England usw., aber auch Japan Handelspartner waren,sind es heute meist tropische Länder,häufig auch Entwicklungsländer,welche die Fischmehle liefern.

Aus Wasserisothermenkarten für diese Länder geht hervor,daß an ihren Küsten vergleichsweise recht hohe Wassertemperaturen herrschen,die in unmittelbarer Ufernähe und im Brackwassergebiet sowie in den Flüssen der Gebiete sicher noch weit höher liegen.Wenn diese Temperaturen auch nicht das Temperaturoptimum der Salmonellen,das bei 37'C liegt,erreichen,so sind doch die Lebensbedingungen für die Keime besser als in unseren Breiten.

Wenn man nicht auf die Fischmehllieferungen aus diesen Ländern verzichten möchte,müssen Wege gefunden werden zur hygienisch einwandfreien Gewinnung und Herstellung der Fischmehle bzw. Möglichkeiten gefunden werden,es zu verhindern,daß die im Importland ankommende Ware infiziert ist.

Von Seiten des Einfuhrlandes,der Bundesrepublik Deutschland,hat man versucht,sich gegen die Einschleppung von Salmonellen mit den Futtermitteln durch Erlaß entsprechender Verordnungen der Bundesländer zu schützen (z.B.26).

Seit Inkrafttreten dieser Futtermittelverordnung ist ein Rückgang der Verseuchungsziffer zu verzeichnen,und zwar von 4,7% 1958 über 8,5% 1959 auf 2,0% 1960.
Ein Vergleich der angegebenen Zahlen ist nur ungefähr möglich,da nicht jede eingeführte Charge untersucht wurde und seit Inkrafttreten der Futtermittelverordnung nach §2 auch nur ein bestimmter Prozentsatz der Ware untersucht wird.

Bevor nun auf die Frage eingegangen wird,wie und wodurch das Fischmehl infiziert werden kann,soll zunächst kurz dargestellt werden, wie nach ADAM (1) der Fabrikationsprozeß von Fischmehl läuft.
Der übliche Fabrikationsprozeß gliedert sich danach in zwei Phasen.Die erste stellt die Fischölgewinnung dar.Dazu werden die Fische auf eine Temperatur von 90-100'C erhitzt und anschließend die heiße Masse ausgepreßt.Der Preßsaft wird durch Zentrifugieren in Leimwasser und Fischöl getrennt.Die Preßrückstände stellen das Ausgangsmaterial für die Fischmehlherstellung dar.

In der zweiten Phase werden die Preßrückstände gegebenenfalls unter Zusatz von Leimwasser getrocknet und anschließend zermahlen. In unseren Breiten kann die Trocknung wegen der klimatischen Bedingungen nur durch einen zweiten Erhitzungsvorgang durchgeführt werden.Dadurch können die in der Rohware enthaltenen Keime bis

auf thermoresistente Sporen abgetötet werden.

In tropischen Ländern fällt dieser zweite Erhitzungsvorgang jedoch weg. Hier wird das ausgepreßte Fischmaterial auf Betonbahnen an der freien Luft in der Sonne getrocknet.Das Ausbreiten und Umschaufeln geschieht durch Arbeiter.

Eine andere,natürlich viel primitivere Art der Fischmehlgewinnung besteht in der sofortigen Trocknung der gefangenen Fische an der Sonne, ohne vorherige Ölgewinnung.Sie wird meist da angewendet,wo kleine Fische als Ausgangsmaterial dienen.

Als Wege zu einer Infektion des Fischmehles kommen nun in Frage:

1. Das Rohmaterial,d.h. die Fische selbst sind infiziert.
2. Sekundärinfektionen.
   a)Durch passager erkrankte,aber gesundgebliebene,arbeitsfähige Keimträger.
   b)Durch infizierte Möven,Ratten oder andere Tiere,die mit den in der Sonne trocknenden Fischen in Berührung kommen können.
   c)Durch mit Erregern verschmutzte Säcke oder sonstiges Verpackungsmaterial.
   d)Durch Lagerung neben infizierten Einfuhren.

Zunächst wäre zu sagen,daß eine Sekundärinfektion immer denkbar ist,zumal das Fischmehl mit seinem hohen Eiweißgehalt ein guter Nährboden für das Bakterienwachstum ist.

Die bei der Trocknung beschäftigten Menschen kommen als Infektionsquelle in Betracht,soll doch nach Angaben von HUGHES (zitiert nach ADAM (1)) beispielsweise jeder achte Eingeborene an der Goldküste Afrikas eine Typhus- oder Paratyphusinfektion überstanden haben.

Da sich die Trockenplätze in Seenähe befinden, dienen sie sicher vielen Seevögeln als Futterplätze.Hier sei nochmals auf die Arbeit von STEINIGER (22) hingewiesen,der darstellt,daß Vögel in der Regel als Dauerausscheider gelten können.

Nach anderen Berichten kommen weiterhin auch andere Tiere als Keimüberträger in Betracht, wie z.B.positive Befunde von Salmonellen bei Schnecken,Schildkröten,Ratten und Hunden zeigen.

Die Möglichkeit der Infektion durch gebrauchte,kontaminierte Säcke müßte nach der viehseuchenpolizeilichen Verordnung über die Ein- und Durchfuhr von Futtermitteln tierischer Herkunft aus dem Ausland,in der es in §6 heißt, daß Futtermittel tierischer Herkunft nur in unbenutzten Papiersäcken eingeführt werden dürfen (26),bei Beachtung dieser Bestimmung wohl fallengelassen werden.

All die genannten Möglichkeiten der sekundären Infektion ließen sich durch bakteriologische Maßnahmen ausschalten.Schwieriger wäre es,wenn das Fischmaterial zur Herstellung des Mehles schon infiziert wäre.

Zur Frage,ob eine primäre Infektion des Rohmaterials,d.h. der Fische möglich ist,bestehen in der Literatur recht unterschiedliche Ansichten.

LUDORFF (11) meint,daß die Lebensmittelvergiftungen durch Fisch dadurch zu erklären seien,daß Salmonellen nach dem Schlachten auf den Fisch gelangt sind.Er hält die Infektion lebender Fische bei starkem Befall zwar für möglich, sie wurde aber nach seinen Angaben nur vereinzelt und dann bei Süßwasserfischen beobachtet.

Von HAMMER (8) wird ein Fall berichtet,in dem der Nachweis von S.cholerae suis (var. kunzendorf) in einer Zuchtforelle in einer Forellenaufzuchtanstalt gelang.Das Tier war mit Schlachtabfällen vom Schwein gefüttert worden.

FLOYD und JONES(6) geben folgenden Bericht von Untersuchungen an Nilfischen,die auf dem Kairoer Fischmarkt gekauft wurden.Die Fische wurden sortiert und jeweils Material von 3 Tieren zusammen untersucht.Der sterilen Eröffnung der Tiere folgte die Entnahme von 1-2 g Darminhalt. Es wurde gezeigt,daß in diesem Darminhalt Salmonellen vorhanden waren.Die Fische hatten in stark verunreinigtem Wasser gelebt.Nach Meinung der

Autoren sind die Untersuchungsergebnisse kein Beweis,daß die Fische infiziert waren,sondern daß die Fische zeitweise als Wirt für die Keime dienen.Die Frage,wie lange Fische die Salmonellen beherbergen,bleibt unbeantwortet. Die Autoren verweisen auf die Arbeit von BRUNNER(4). Bei den Untersuchungen von FLOYD und JONES bestand eine auffallende Parallele zwischen den aus den Fischen isolierten und den am Ort bei menschlichen Erkrankungen ermittelten Typen.

BRUNNER (4) beschreibt unter dem Titel "Fische als Bazillenträger" folgende Experimente,bei denen Karpfen,Schleie,Plötzen,Rotfedern, Aitel,Brachsen,Grünlinge und Forellen als Versuchstiere dienten:

1. Infektion der Fische durch infiziertes Futter. Diese Infektion gelingt leicht,und zwar am besten,wenn 3 Tage hintereinander infiziertes Schabefleisch verfüttert wird.24-48 h nach der Infektion sind die Bakterien in allen Organen, in der Muskulatur und dem strömenden Blut der Fische nachzuweisen.8-14 Tage nach der Bakterienaufnahme verschwanden die Keime aus den Organen und aus der Muskulatur,waren aber im Kot und im Darm fast regelmäßig noch einige Wochen nachweisbar;nach 4-6 Wochen waren die Untersuchungsergebnisse negativ.
2. Infektion der Fische durch Haltung in verseuchtem Wasser.
   Zur Verseuchung des Aquariumwassers diente eine

24 h Enteritis-Bakterien-Kultur von Schrägagar auf 10 l Wasser. Lief der Versuch längere Zeit, so wurde einmal täglich das Aquariumwasser beimpft. Die Fische infizierten sich, wie BRUNNER meint, besonders leicht, wenn Haut- und Kiemenverletzungen vorlagen, wie sie durch die Haltung der Tiere in der Wasserleitung entnommenem und daher chlorhaltigem Wasser leicht vorliegen. So ergab sich nach einem Aufenthalt der Fische von wenigen Stunden in dem verseuchten Wasser eine Infektion der inneren Organe

3. Zur Klärung der Frage der Lebensdauer von Enteritisbakterien im Fischkörper wurden Karpfen 2 ccm Bakterienaufschwemmung in den dorsalen Lymphraum injiziert. Nach 24 h fanden sich die Erreger im gesamten Fischkörper und noch nach einem Vierteljahr waren Erreger in sämtlichen Organen des getöteten Fisches nachweisbar.

Die von BRUNNER beschriebenen Versuche werden von anderen Autoren wie FLOYD und JONES angezweifelt, da das Impfmaterial in der Natur viel geringer ist. Auch SCHÄPERKLAUS (18) warnt vor zu weitgehenden Schlüssen aus den Laboratoriumsversuchen.

Aufgabenstellung

Die folgenden Untersuchungen über die Lebenszeit von Salmonella-Bakterien in Warmwasserfischen sollen zur Klärung der Frage beitragen, ob eine primäre Infektion der Fische als Ursache der Verseuchung der eingeführten Fischmehle anzunehmen ist.

Folgende Fragen sollen geklärt werden:

1. Wie lange lassen sich die Bakterien in dem die Fische umgebenden Wasser nachweisen?

2. Wie lange können Salmonella-Bakterien in den Fischen leben?

3. In welchen Organen der Fische haften, bzw. reichern sich die Bakterien an?

Material und Methoden

Für die Untersuchungen wurden verschiedene Aquarien eingerichtet. Zur Klärung der Fragen dienten als Versuchstiere Guppies (Lebistes reticulatus) und außerdem Goldfische (Carassius carassius aureatus) zur Klärung der Frage 3 (In welchen Organen der Fische haften, bzw. reichern sich die Bakterien an?)

Die Fische wurden mit einem industriellen Trockenfutter, das nach Angaben des Herstellers ein reines Naturfutter ist und aus tierischen und pflanzlichen Rohstoffen hergestellt wird, gefüttert.
In einigen Probeuntersuchungen konnten darin nie Salmonella-Bakterien nachgewiesen werden.

Keines der Aquarien hatte während der Dauer der Versuche Filter, wie es sonst bei der Haltung von Zierfischen üblich ist, weil eine mechanische Reinigung die Untersuchungen gestört hätte. Es sollte ja in Analogie zu dem verunreinigten Süß- und Brackwasser an den Küsten der Herkunftsländer der Fischmehle untersucht werden, wie lang die Lebenszeit von Salmonellen in relativ verschmutztem Wasser ist

Aus den Aquarien verdunstetes Wasser wurde mit Aqua destillata aufgefüllt, das für die Verdünnungsreihen und die Membranfiltration entnommene Wasser durch Leitungswasser ersetzt.

Zur Infektion von Aquarien und Fischen wurde S.anatum gewählt, ein Stamm aus der E_1 Gruppe mit der Antigenformel 3,10:e,h:1,6 , weil diese Salmonella oftmals aus importiertem Fischmehl gezüchtet wurde und ein weitverbreiteter Enteritiserreger ist.

Nach der Infektion wurde aus den verschiedenen Aquarien in gewissen Zeitabständen Wasser entnommen und davon Verdünnungsreihen angesetzt. Von den jeweiligen Verdünnungsstufen wurden 0,3 ml auf Nährböden gleichmäßig verteilt. (0,3 ml ist die Flüssigkeitsmenge, die erfahrungsgemäß am besten auf einer normalen Petrischale von 9 cm Durchmesser gleichmäßig verläuft.) Nur die ersten beiden Verdünnungsreihen der ersten Versuchsreihe wurden auf Endoplatten (Milchzucker-Fuchsinagar) ausgeimpft. Bei der Diagnostik der Salmonellen von der Endoplatte ergaben sich aber Schwierigkeiten, die Salmonellen sicher von den begleitenden Bakterien aus den Aquarien zu unterscheiden. Deshalb wurde von der 3. Verdünnungsreihe an ein Selektivnährboden zu Hilfe genommen, auf dem das Wachstum anderer Bakterienarten gehemmt wird.
Solche Selektivnährböden sind u.a. der Nährboden nach LEIFSON (Laktose, Neutralrot als Indikator, Natriumdesoxycholat, Natriumzitrat und Brillantgrün enthaltend), der sog. SS-Agar (Salmonella-Shigella-Agar), bei dem anstelle von Natriumdesoxycholat Rindergalle

zugesetzt wird, und der Wismutsulfitagar nach Wilson-Blair.
Von diesen Selektivnährböden wurde der SS-Agar gewählt und zuerst SS-Agar neben Endo-Agar verwendet und dann,nachdem sich der neue Nährboden sehr bewährt hatte, nur noch SS-Agar verwandt.

Bei der Verwendung von SS-Agar wurden die beimpften Platten 24 h bei 37'C bebrütet,und anschließend blieben sie weitere 24 h bei Zimmertemperatur stehen. Danach zeigten die Salmonella-Kolonien,umgeben von einer weißlich-glasigen Randzone,einen schwarzen Mittelpunkt.
(Der SS-Agar enthält Ferrizitrat,das sich mit dem von den Salmonellen gebildeten Schwefelwasserstoff zu Schwefeleisen verbindet.-Ebenso wie die Salmonellen bilden auch Proteus-Bakterien auf diesem Nährboden Schwefeleisen.Während die Salmonellen aber erst nach 48 h Bebrütung Schwarzfärbung zeigen,findet man bei Proteus-Bakterien bereits nach 24 h intensive Schwärzung im Zentrum der Kolonie.)
Durch die Verwendung des Spezialagars wurde die Auszählung der Kolonien und ihre Identifizierung als Salmonellen wesentlich erleichtert,weil auf der Endo-Platte auch andere Keime,die sich schon vor Versuchsbeginn in den Aquarien befunden hatten, wie Salmonellen als glasige,laktose-negative Kolonien wuchsen.War also bei der Verwendung von Endo-Platten eine Probeagglutination mit spezifische Antikörper enthaltenden Seren in jedem Falle nötig,

so brauchten durch Zuhilfenahme der SS-Agar-Platten nur selten fragliche Kolonien agglutiniert zu werden.
Dennoch wurden häufig Kolonien, die sicher Salmonellen waren, mit spezifischen Seren agglutiniert, um die Gewißheit zu haben, daß es sich immer um S. anatum handelte und sich nicht etwa andere Salmonella-Typen eingeschlichen hatten. Durch diese Agglutination wurde jedoch stets S. anatum nachgewiesen.

Sobald die Untersuchung aus den Verdünnungsreihen keine positiven Untersuchungsergebnisse mehr ergab, wurden größere Mengen von Aquariumwasser zur Untersuchung herangezogen, um zu prüfen, ob darin noch ein Salmonellanachweis gelang.
An der Wasserstrahlpumpe wurden mittels Membranfilter Wassermengen von 50-150 ml filtriert, die Membran zur Anreicherung in Kölbchen mit ca. 30 ml Inhalt an Selenitbrühe nach LEIFSON gebracht und dann nach 24 h Bebrütung Material mit der Platinöse auf SS-Agar-Platten ausgeimpft. Die Bebrütung der SS-Agar-Platten und die Salmonella-Diagnostik geschahen nach der S. 27 und 28 beschriebenen Art.
Die Filtration noch größerer Mengen von Aquariumwasser wurde durch die Verschmutzung des Wassers durch den Kot der Fische, faulende Pflanzenteile usw. erschwert.

In zeitlichen Abständen wurden den Aquarien Fische entnommen. Mit einem Köcher wurden jeweils meist zwei Fische gefangen und in Standgläser mit Leitungswasser gebracht, und zwar so, daß die Fische getrennt, aus jedem Aquarium in einem anderen Glas waren.
In diesem Standglas wurden die Fische einige Zeit belassen und das Wasser ca. 5x erneuert. Dieses Spülen sollte dazu dienen, evtl. auf der Oberfläche der Fische befindliche Salmonellen möglichst abzuwaschen. Dann wurden die Tiere in sterile Schälchen getan und sofort mit sterilen Scheren hinter dem Kiemendeckel decapitiert. Mit sterilen Pinzetten wurden die Eingeweide entnommen, wobei größte Sorgfalt darauf verwendet wurde, daß der Darm vollständig erhalten blieb. Wegen der Kleinheit der Fische war die Isolierung einzelner Teile der Fische nicht immer mit völliger Sicherheit möglich, jedoch kann gesagt werden, daß die Kiemen immer zusammen mit dem Kopf abgetrennt wurden.
Die Trennung in einzelne Organe gelang bei den Guppies nicht, obwohl sie auch unter dem Plattenmikroskop versucht wurde, doch waren hier die schnelle Eintrocknung und die Kleinheit der Objekte sehr hinderlich.
Die Guppies wurden also folgendermaßen seziert:

Kopf mit Kiemenregion
Darm und alle übrigen inneren Organe
Fischrumpf (mit Muskulatur, Haut usw.)

Die so gewonnenen Teile wurden in Selenitbrühe nach LEIFSON 24 h bei 37'C im Brutschrank aufbewahrt.Es wurden Reagensgläser mit einem Inhalt von ca. 3 ccm Selenitbrühe verwendet.Nach dieser Bebrütung und Anreicherung der Salmonellen wurde mit einer Platinöse Material entnommen und auf SS-Agar-Platten ausgeimpft.Die Platten wurden wieder 24 h bebrütet,dann weitere 24 h bei Zimmertemperatur stehen gelassen und dann ausgewertet.

Versuch Nr. I

Zur Klärung der Fragen:

1. Wie lange lassen sich Salmonella-Bakterien in dem die Fische umgebenden Wasser nachweisen?
2. Wie lange können Salmonellen in den Fischen leben?
3. In welchen Organen der Fische haften bzw. reichern sich die Bakterien an?

wurden vier Aquarien eingerichtet,jedes unter etwas anderen Bedingungen.Drei der Aquarien hatten je 36 l Wasserinhalt,das vierte 3,3 l. Die Wassertemperatur wurde auf 26-27'C eingestellt.

Das erste Aquarium
enthielt klares Wasser;der Boden war mit Kies belegt,darin einige Wasserpflanzen verankert. Außerdem befand sich im Aquarium eine kleine Menge Wasserflöhe (Daphnia).

Das zweite Aquarium
enthielt klares Wasser mit Kies am Boden,Wasserpflanzen und einige Schnecken.Es war luftdurchperlt.15 Guppies lebten in dem Aquarium.

Das dritte Aquarium
enthielt sehr trübes Wasser mit Wasserpflanzen, Kies am Boden und etwa 35-45 Guppies;außerdem waren Schnecken darin.Es war luftdurchperlt.

Das vierte Aquarium
enthielt das gleiche trübe Wasser wie das dritte Aquarium (es war aus diesem entnommen worden), Wasserpflanzen und war nicht luftdurchperlt.

Die Aquarien wurden bereits mehrere Wochen vor Versuchsbeginn eingerichtet,um möglichst konstante und eingespielte Bedingungen in ihnen vorzufinden.Während im dritten Aquarium auch die Fische schon längere Zeit lebten,wurden sie in das zweite und das vierte Aquarium erst kurz vor Versuchsbeginn eingesetzt.
In einem Vorversuch wurde geprüft,ob in den noch nicht künstlich infizierten Aquarien vielleicht

schon Salmonellen enthalten wären und bis zu welchem Verdünnungsgrad Bakterien in den Aquarien nachzuweisen wären.
Dabei ergab sich, daß im dritten und vierten Aquarium Keime bis zu einer Verdünnung von 10^{-1} gefunden werden konnten, während die Titer im ersten und zweiten Aquarium niedriger waren.
Laktose-negative, evtl. salmonellaverdächtige Kolonien wurden in der Bunten Reihe weiteruntersucht, wobei sich jedoch nie Salmonellen fanden. In einem Falle wurde ein E. coli Stamm mit dem Salmonella-Antigen O 17 gefunden.

Ausgehend von der Erfahrungstatsache, daß 1 ml einer 24 h Bouillon von Bakterien 1-10 Milliarden Keime enthält, wurde angenommen, 1 ml Bouillon enthielte 1 Milliarde Keime. 1 ml Aquariumwasser sollte ca. 150 000 Keime enthalten. Deshalb wurden das erste, das zweite und das dritte Aquarium mit je 5 ml, das vierte Aquarium, dem geringeren Wasserinhalt entsprechend, mit 0,46 ml einer 24 h Bouillon von S. anatum infiziert.
(Am 7. Tag nach der Infektion der Aquarien Nr. II und Nr. III wurde je ein Fisch nach einer anderen Methode als S. 29 beschrieben untersucht, und zwar indem die Tiere nach dem Decapitieren in kleine Stückchen geschnitten und dann in Selenitbrühe gegeben wurden. Ausimpfung usw. geschah nach S. 30 genannter Methode.)
(Am 9. Tag nach der Infektion fanden sich im

Aquarium Nr.III 3 tote Fische.Ihre Untersuchung ergab stark positive Ergebnisse.Die toten Tiere hatten sich über Nacht in dem Becken befunden, es waren daher für die Keime in ihrem Innern und auf der Oberfläche gute Bedingungen zur Vermehrung gegeben.Da die übrigen Fische nach der Infektion keinerlei Krankheitszeichen boten,ist es unwahrscheinlich,daß die Fische an den Folgen der Infektion zugrunde gegangen sind.)

Es zeigte sich,daß zur genaueren Klärung der Frage:In welchen Organen der Fische haften bzw.reichern sich die Bakterien an,die Fischart Guppy zu klein war.-Deshalb wurden zu diesen Untersuchungen Goldfische (Carassius carassius aureatus) als Versuchstiere benutzt.

Versuch Nr.II

In ein Aquarium von ca. 44 l Wasserinhalt wurden 6 Goldfische von ca. 10 cm Länge eingesetzt.Der Boden war mit Kies bedeckt,darin einige Wasserpflanzen verankert.Das Wasser war luftdurchperlt, außerdem lebten wenigen Schnecken in den Becken. Die Wassertemperatur betrug auch hier 26-27'C. Das Aquarium wurde gemäß den Ausführungen S.32 mit 19,5 ml einer 24 h Bouillon von S. anatum infiziert.
Verdünnungsreihen wurden angesetzt und die Membranfiltrationen durchgeführt.

Am 34. Tag nach der Infektion des Aquarium wurde der erste Fisch gefangen und gut abgespült.Dann wurde das Tier mit sterilen Instrumenten decapitiert und evisceriert.Die gewonnenen Organe wurden wiederum 24 h in Selenitbrühe nach LEIFSON bebrütet und am folgenden Tag Material davon mit der Platinöse auf SS-Agar ausgeimpft. Behandlung der Platten und die Diagnostik geschahen in S.27 und 28 beschriebener Weise.
In gewissen zeitlichen Abständen wurden die übrigen Fische in gleicher Weise untersucht.

Versuch Nr.III

Zur Klärung der Frage,in welchen Organen der Fische die Bakterien haften,bzw. sich anreichern, wurde ein weiteres Aquarium eingerichtet.Der Boden war mit Kies bedeckt,darin einige Wasserpflanzen verankert.Das Becken war luftdurchperlt.

Zwei etwa 10 cm langen Goldfischen wurde mit einer Pipette ca. 5 ml einer 24 h Bouillon von S. anatum ins Maul einpipettiert. Wieviel die Fische von diesen 5 ml enteral aufnahmen und wieviel wieder ausgestrudelt wurde,kann nicht gesagt werden.
Nach der Infektion wurden die Fische gut in Wasser gespült und anschließend in das Aquarium ausgesetzt. In der folgenden Zeit wurden Wasserproben aus dem Aquarium entnommen,um zu sehen,ob Salmonellen von

den Fischen in das Wasser ausgeschieden wurden. Die Wasserproben wurden mit einem Membranfilter an der Wasserstrahlpumpe filtriert,das Filterpapier in Selenitbrühe gebracht und nach 24 h Bebrütung Material davon auf SS-Agar-Platten ausgeimpft.
Am 5. Tag nach der Infektion der Fische wurde der Kotfaden eines Fisches direkt auf SS-Agar ausgestrichen.
Am 21. Tag nach der Infektion wurde der eine Fisch getötet,der andere am 93. Tag nach der Infektion.Die getrennten Organe wurden wieder nach der beschriebenen Weise bearbeitet(S.29-30)

Ergebnisse Versuch Nr.I

a) Verdünnungsreihen

Erstes Aquarium

Zahlenangaben=Anzahl der Kolonien von S.anatum
O =Negative Untersuchungsergebnisse
Freie Felder =Nicht untersuchte Verdünnungsstufen

Tag nach der Infektion	1.	2.	3.	4.	5.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	16.
Original		ca.2000	150	29	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0
10^{-1}	ca.2000	ca. 800	55	10	1		0							
10^{-2}		180	4	0	0									
10^{-3}	80	28	0											
10^{-4}		6												
10^{-5}	0	0												
10^{-6}														
10^{-7}														

Ergebnisse Versuch Nr.I

a) Verdünnungsreihen

Zweites Aquarium

Zahlenangaben=Anzahl der Kolonien von S.anatum
0 =Negative Untersuchungsergebnisse
Freie Felder =Nicht untersuchte Verdünnungsstufen

Tag nach der Infektion	1.	2.	3.	4.	5.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	16.
Original		57	13	2	0	4	5	4	2	0	1	0	0	0
10^{-1}	ca.1500	35	7	1		0	2	3	1		1			
10^{-2}		1	1	0			0	0	0		0			
10^{-3}	81	0	0											
10^{-4}														
10^{-5}	1													
10^{-6}	0													
10^{-7}														

Ergebnisse Versuch Nr.I

a) Verdünnungsreihen

Drittes Aquarium
Zahlenangaben=Anzahl der Kolonien von S.anatum
O =Negative Untersuchungsergebnisse
Freie Felder =Nicht untersuchte Verdünnungsstufen

Tag nach der Infektion	1.	3.	4.	5.	7.	8.	9.	10.	11.	12	14	16.	18	21.	23.
Original		150	1	1	4	2	24	16	45	10	10	15	8	4	0
10^{-1}	ca.1200	23	1	1	4	1	12	6	20	13	5	9	0	3	0
10^{-2}		6	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0		0	
10^{-3}	16	0								0	0				
10^{-4}															
10^{-5}	0														
10^{-6}															
10^{-7}															

Ergebnisse Versuch Nr.I

a) Verdünnungsreihen

Viertes Aquarium

Zahlenangaben=Anzahl der Kolonien von S.anatum

0 =Negative Untersuchungsergebnisse

Freie Felder =Nicht untersuchte Verdünnungsstufen

Tag nach der Infektion	1.	2.	3.	4.	5.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	14.
Original		216	134	170	ca.110	7	30	54	3	60	17	12
10^{-1}	ca.2000	93	49	68	ca. 70	9	12	33	3	20	6	3
10^{-2}		16	8	6	0	0	0	0	0	3	1	0
10^{-3}	55	3	3	1	0					0	0	
10^{-4}		0	0	0								
10^{-5}	2											
10^{-6}	0											

Tag nach der Infektion	16.	18.	21.	23.	25.	28.	30.	32.	35.	38.
Original	5	51	12	5	16	1	1	1	9	0
10^{-1}	2	15	4	2	4	0	0	0	1	0
10^{-2}	0	0	1	0	0	0			0	
10^{-3}			0							
10^{-4}										
10^{-5}										
10^{-6}										

Ergebnisse Versuch Nr.I

a) Verdünnungsreihen

Graphische Darstellung der Untersuchungsergebnisse.

Ergebnisse Versuch Nr.I

b) Membranfiltration

Tag nach der Infektion	Erstes Aquarium	Zweites Aquarium	Drittes Aquarium	Viertes Aquarium
7.		10 ml + 100 ml +	10 ml + 50 ml +	
16.	50 ml -			
18.	100 ml -	50 ml -		
21.		100 ml -		
23.		150 ml -		
25.			100 ml -	
35.			100 ml -	
41.				50 ml +
44.				50 ml -
48.		100 ml +	100 ml -	50 ml +
50.		100 ml -	100 ml -	
56.		100 ml +		100 ml -
63.		100 ml +		100 ml -
66.			100 ml -	
71.		50 ml - 100 ml -		
79.		100 ml -		
101.		100 ml -	100 ml -	
128.		100 ml -		
168.		100 ml -		
175.		50 ml - 100 ml +		
191.		100 ml +		
212.		100 ml -		
244.		100 ml -		

Tag nach der Infektion	Erstes Aquarium	Zweites Aquarium	Drittes Aquarium	Viertes Aquarium
272.		50 ml + 100 ml +		
290.		50 ml +		
309.		100 ml -		
356.		50 ml + 100 ml +		
363.		50 ml - 100 ml -		
383.		50 ml - 100 ml -		
416.		50 ml - 100 ml -		
458.		50 ml - 100 ml -		
499.		100 ml -		
549.		50 ml - 100 ml -		

\+ =Positives Untersuchungsergebnis

\- =Negatives Untersuchungsergebnis

Freie Felder =Nicht untersucht

Ergebnisse Versuch Nr.I

c) Untersuchung der Fische

Tag nach der Infektion	Aquarium Nr.	Kopf mit Kiemenregion	Darm und innere Organe	Fischrumpf (Muskulatur Haut usw.)
7.	III	-	+	-
11.	III	+	+	-
14.	III	-	+	-
16.	III	+	-	-
	III	-	+	+
28.	III	-	-	-
	III	-	+	-
	III	-	-	-
30.	II	-	-	-
	II	-	-	-
	III	-	+	-
	III	-	+	-
32.	II	-	-	+
	III	+	+	-
	III	-	-	-
39.	II	-	+	-
	II	-	+	-
	III	-	-	-
	III	-	-	-
45.	II	-	+	+
	II	-	+	-
	III	-	-	-
	III	-	+	-
52.	II	-	+	+
	II	-	+	-
	III	-	-	-
	III	-	-	-

Tag nach der Infektion	Aquarium Nr.	Kopf mit Kiemenregion	Darm und innere Organe	Fischrumpf (Muskulatur Haut usw.)
59.	II	-	+	-
	II	-	+	-
	III	-	-	-
	III	-	-	-
66.	II	+	+	+
	II	-	+	-
	III	-	-	-
	III	-	-	-
71.	II	-	-	+
	II	+	+	+
	III	-	-	-
	III	-	-	-
83.	II	-	+	-
	II	-	+	-
101.	II	-	-	-
	II	-	-	-
	III	-	-	-
	III	-	-	-
116.	II	-	+	+
	II	+	-	-
128.	II	+	+	+
	II	-	+	+
142.	II	-	+	+
	II	+	+	-
153.	II	-	+	+
	II	+	+	-
168.	II	-	+	-
	II	+	+	+

Tag nach der Infektion	Aquarium Nr.	Kopf mit Kiemenregion	Darm und innere Organe	Fischrumpf (Muskulatur, Haut usw.)
191.	II	+	+	-
	II	-	-	+
212.	II	+	-	-
	II	-	+	-
244.	II	-	-	-
268.	II	-	+	-
290.	II	-	+	-
	II	-	-	-
309.	II	-	-	-
	II	-	-	-
318.	II	-	+	-
363.	II	-	-	-
383.	II	-	-	-
	II	-	-	-
416.	II	-	-	-
458.	II	-	-	-
499.	II	-	-	-
	II	-	-	-
549.	II	-	-	-
	II	-	-	-

\+ =Positives Untersuchungsergebnis

\- =Negatives Untersuchungsergebnis

Ergebnisse Versuch Nr. II

a) Verdünnungsreihen

Tag nach der Infektion	1.	3.	6.	9.	10.	13.	15.	17.	20.
Original			17	3	4	8	1	0	0
10^{-1}			8	1	1	5	1	0	0
10^{-2}		4	1	0	1	0	0	0	
10^{-3}	133	0	0	0	0	0	0	0	
10^{-4}	15	0	0						
10^{-5}	4	0							
10^{-6}	0	0							
10^{-7}	0	0							

Zahlenangaben=Anzahl der Kolonien von S. anatum
0 =Negative Untersuchungsergebnisse
Freie Felder =Nicht untersuchte Verdünnungsstufen

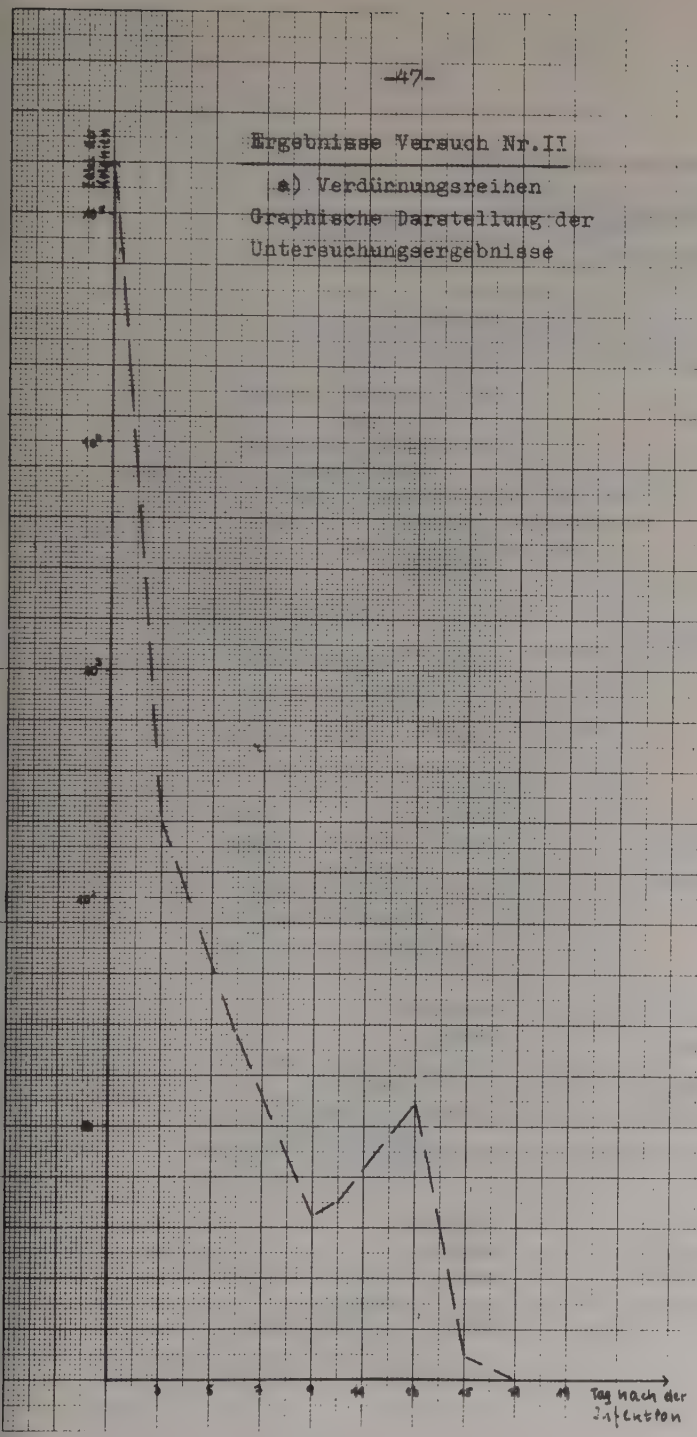
b)Membranfiltration

Tag nach der Infektion	
22.	50 ml + 100 ml +
28.	100 ml +
34.	100 ml +
44.	100 ml -
52.	100 ml -

\+ =Positives Untersuchungsergebnis
\- =Negatives Untersuchungsergebnis

Ergebnisse Versuch Nr.II

a) Verdünnungsreihen
Graphische Daratellung der
Untersuchungsergebnisse



Untersuchungsergebnisse

Versuch Nr.II

c) Untersuchung der Fische

1.Fisch	Kiemen	+
34. Tag nach der Infektion	Ovar	-
	Darm	+
	ges. übrige innere Organe	-
	steril entnommene Muskulatur	-
	Fischrumpf und Kopf	-
2.Fisch	Kiemen	+
44. Tag nach der Infektion	Leber	-
	Ovar	-
	Darm	+
	steril entnommene Muskulatur	-
	Kopf	-
	ges.übriger Fisch	+
3.Fisch	Kiemen	-
81. Tag nach der Infektion	Darm	+
	ges. übrige innere Organe	-
	steril entnommene Muskulatur	-
	Fischrumpf und Kopf	-
4.Fisch	Kiemen	-
93. Tag nach der Infektion	Darm	-
	ges. übrige innere Organe	-
	steril entnommene Muskulatur	-
	Fischrumpf und Kopf	-
5.Fisch	Kiemen	-
133. Tag nach der Infektion	Darm	-
	ges. übrige innere Organe	-
	steril entnommene Muskulatur	-
	Fischrumpf und Kopf	-

6. Fisch	Kiemen	-
198. Tag nach der Infektion	Darm	-
	ges. übrige innere Organe	-
	steril entnommene Muskulatur	-
	Fischrumpf und Kopf	-

\+ =Positives Untersuchungsergebnis
\- =Negatives Untersuchungsergebnis

Ergebnisse Versuch Nr.III

a) Membranfiltration

Tag nach der Infektion	
2.	100 ml -
5.	100 ml -
8.	100 ml -
9.	100 ml -
12.	100 ml -
14.	100 ml -
16.	100 ml -
19.	100 ml -
20.	100 ml -

\- =Negatives Untersuchungsergebnis

b) Ergebnis der Untersuchung des auf SS-Agar überimpften Kotfadens:
Es fand sich eine Mischkultur, aus der S.anatum isoliert werden konnte.

c) Untersuchungsergebnis
des am 21.Tag nach der Infektion getöteten Fisches:
In den Kiemen konnte S. anatum nachgewiesen werden.

Ergebnis der Untersuchung
des am 93. Tag nach der Infektion untersuchten Fisches:
In keinem der isolierten Teile konnte S. anatum nachgewiesen werden.

Diskussion der Ergebnisse

Versuch Nr.I

a) Verdünnungsreihen aus den vier Aquarien.
Aus den vorstehenden Tabellen und der Kurve läßt sich entnehmen,daß das erste Aquarium vom 9.Tag, das zweite Aquarium vom 13. Tag,das dritte Aquarium vom 23.Tag und das vierte Aquarium vom 38. Tag nach der künstlichen Infektion der Becken mit einer 24 h Bouillon von S.anatum keine positiven Salmonellanachweise in den beschriebenen Verdünnungsreihen mehr erbrachten.
Es zeigt sich,daß die Salmonella-Bakterien je nach den in den Aquarien herrschenden Bedingungen (s.S.31) unterschiedliche Lebenszeit haben.So finden sie sich in den klares Wasser enthaltenden,mit Wasserpflanzen beschickten Becken Nr.I und Nr.II etwa gleich lange (9 bzw. 13 Tage). Offenbar spielt die Frage der Belüftung des Wassers keine so entscheidende Rolle. Durch starke Verschmutzung des Wassers scheinen sich die Lebensbedingungen für die Bakterien zu verbessern (Aquarium Nr. III Salmonellanachweis bis zum 23.Tag p.I.),und in dem Aquarium Nr.IV ,das zuletzt voll von faulenden und gärenden Pflanzenteilen war, da hier die Belüftung fehlte, sind im Rahmen der Untersuchungen die besten Bedingungen vorhanden gewesen (Salmonella-Nachweis bis zum 38.Tag nach der Infektion.)
Betrachtet man die graphische Darstellung, in der die sich ergebenden Kurven der vier Aquarien neben-

einander aufgezeichnet sind (s.S.40),so zeigt sich bis zum 7.Tag nach der Infektion der Aquarien etwa ein massiver Titerabfall.Vom 8.-9.Tag erfolgt dann wieder ein Anstieg,vom 10.-11.Tag ein Abfall und am 11. und 12. Tag nochmals ein deutlicher Titeranstieg.
Diese Titerschwankungen könnten nun einmal dadurch bedingt sein,daß in dem entnommenen Wasser zufällig einmal mehr,einmal weniger Keime enthalten waren.Es ist jedoch auffällig,daß sich die Titerschwankungen in allen vier Aquarien wiederholen.
Dieses läßt auch die Möglichkeit vermuten,daß es sich um echte Vermehrung,bzw. echtes Absterben der Salmonellen handelt.
Verbindlich kann diese Frage nicht beantwortet werden.

b) Membranfiltration von Aquariumwasser.
Durch die Membranfiltration größerer Mengen von Aquariumwasser konnte nur im zweiten und vierten Aquarium der Salmonella-Nachweis wesentlich länger erbracht werden als mit den Methoden der Verdünnungsreihe.In den anderen Aquarien konnten, nachdem die Untersuchungen in den Verdünnungsreihen negativ waren, auch durch die Filtration keine Salmonellen mehr nachgewiesen werden.
Sehr bemerkenswert sind die positiven Untersuchungsergebnisse von Wasser aus dem zweiten Aquarium vom 48.-63. Tag nach der In-

fektion,nachdem die Ergebnisse vorher für längere Zeit negativ gewesen waren,und die Salmonella-Nachweise vom 175. bis zum 356. Tag nach der Infektion.- Hier folgten also einer Periode von negativen Ergebnissen wieder positive,durch die Filtration von Aquariumwasser gewonnene Resultate.

Wie kamen diese positiven Untersuchungsergebnisse zustande?

Unterschiede in der Wasserentnahmetechnik für die Filtration können auch hier kaum die Ursache sein,vielmehr muß eine Reinfektion des Aquariumwassers erwogen werden.

Betrachtet man die in diesem Zeitraum aus den Organen der getöteten Fische des zweiten Aquarium gewonnen Untersuchungsergebnisse,so fällt auf,daß der Untersuchungsbefund 45,52,59,66,71,84,116,128, 142,153,168,191,212,268,290 und 318 Tage nach der Infektion der Becken meist positiv war.

Die Reinfektion des Aquariumwassers könnte also durch die von den Fischen in ihren Organen beherbergten und dann ausgeschiedenen Salmonella-Keime zustande gekommen sein.

Daß es im dritten Aquarium nicht zu einer Reinfektion des Wassers kam,könnte damit erklärt werden,daß die von den Fischen ausgeschiedenen Bakterien in dem stark verschmutzten Wasser und durch andere,im Aquarium schon vor Versuchsbeginn vorhandene Bakterien ungünstigere Lebensbedingungen fanden.

Eine andere Möglichkeit der Reinfektion nämlich

die durch die Schnecken,die sich in den Aquarien befanden,wurde zunächst nicht so stark bewertet. In der Literatur sind jedoch Salmonellafunde in Schnecken beschrieben.
Als nun 168 Tage nach der künstlichen Infektion der Aquarien immer noch Salmonellafunde in den Fischen des zweiten Aquarium gemacht wurden und sich am 175,191. und 212. Tag nach der Infektion wieder Salmonellen im Aquariumwasser gefanden, wurde auch diese Möglichkeit geprüft.-Zugleich wurden Schlammproben (ca. 3 ccm) entnommen und untersucht.
Zu jeder Untersuchung wurden 4-7 Schnecken dem Aquarium entnommen,gespült und im sterilen Mörser zerkleinert,mit Selenitbrühe aufgeschwemmt und in Reagensgläschen 24 h bebrütet.Die Ausimpfung auf SS-Agar-Platten und die Diagnostik geschahen auf beschriebene Weise.
Auch die Schlammproben von ca. 3 ccm Menge aus dem zweiten Aquarium wurden in Selenit gebracht und dann damit ebenso wie mit den zermörserten Schnecken verfahren.

Untersuchungsergebnisse von Schnecken und Schlamm

Tag nach der Infektion	Schnecken	Ergebnis	Schlamm	Ergebnis
168.	Probe 1	-	Probe 1	+
	Probe 2	-	Probe 2	+
	Probe 3	+		
	Probe 4	+		
175.	Probe 1	+	Probe 1	-
	Probe 2	+	Probe 2	+
	Probe 3	+	Probe 3	+
	Probe 4	+		

Tag nach der Infektion	Schnecken	Ergebnis
191.	Probe 1	+
	Probe 2	+
212.	Probe 1	+
	Probe 2	-
	Probe 3	-
	Probe 4	-
232.	Probe 1	+
244.	Probe 1	+
	Probe 2	+
	Probe 3	+
272.	Probe 1	+
	Probe 2	+
	Probe 3	-
290.	Probe 1	+
	Probe 2	+
	Probe 3	+
363.	Probe 1	-
	Probe 2	-
	Probe 3	-
383.	Probe 1	-
	Probe 2	-
	Probe 3	-
416.	Probe 1	-
	Probe 2	-
	Probe 3	-
458.	Probe 1	-
	Probe 2	-
	Probe 3	-

Die Schnecken im zweiten Aquarium enthielten also Salmonellen, und zwar S. anatum, mit der die Becken infiziert worden waren. Ebenso konnte aus den Schlammproben S. anatum isoliert werden.

Neben der möglichen Reinfektion durch die Fische ergibt sich also eine andere durch die in Schnecken und Schlamm enthaltenen Salmonellen.

Die Möglichkeit der Reinfektion des Wassers und der Fische durch im Schlamm enthaltene und dort überlebende Salmonellen muß aber in Frage gestellt werden,da vor der Wasserentnahme zur Membranfiltration von Aquariumwasser stets sehr gut im Aquarium umgerührt wurde.Erst nach dem 128.Tag, als lange Zeit kein Wasser mehr filtriert wurde, konnten sich hier Salmonellen anreichern,die dann über Schnecken oder Fische dorthin gelangt sein könnten.
Die Frage der Reinfektion ist also sehr komplex und kann nicht endgültig beantwortet werden.

Nach Angaben von SCHAAL (17) hängt die Vermehrungsfähigkeit und damit auch die Dauer des Nachweises der Salmonella-Bakterien vom Eiweißgehalt des die Bakterien umgebenden Wassers ab.
Nach SCHAAL ist eine Menge von 100 ml Eiweißstoffen auf 1 l Wasser notwendig zur Vermehrung der Bakterien.Weiter schreibt der Autor,daß diese Menge in fließendem Wasser selten erreicht wird und daß hier zur Anreicherung der Keime korpusculäres Eiweiß,das durch Sedimentation auf der Sohle des Flußbettes abgelagert wird, dient.
Um zu prüfen,ob die von SCHAAL gemachten Angaben auch für das oben beschriebene Experiment gültig wären,wurde gleich zu Versuchsbeginn eine Stickstoffbestimmung gemacht,um einen Anhaltspunkt für die in den Aquarien enthaltenen Eiweißmengen

zu haben.
Dabei ergaben sich folgende Werte:

Erstes Aquarium	Stickstoff nicht feststellbar
Zweites Aquarium	3,5 γ Stickstoff / ml = 23 γ Eiweiß / ml Aquariumwasser
Drittes Aquarium	10 γ Stickstoff / ml = 65 γ Eiweiß / ml Aquariumwasser
Viertes Aquarium	10 γ Stickstoff / ml = 65 γ Eiweiß / ml Aquariumwasser

Gegen Versuchsende ergaben sich folgende Werte:

Erstes Aquarium	42 γ Stickstoff / ml = 273 γ Eiweiß / ml Aquariumwasser
Zweites Aquarium	42 γ Stickstoff / ml = 273 γ Eiweiß / ml Aquariumwasser
Drittes Aquarium	47 γ Stichstoff / ml = 305,5 γ Eiweiß / ml Aquariumwasser
Viertes Aquarium	47 γ Stickstoff / ml = 305,5 γ Eiweiß / ml Aquariumwasser

Das sind Mengen,die weit unter der von SCHAAL angegebenen Menge von 100 ml Eiweiß / 1 l Wasser liegen.Es bliebe damit nur die Möglichkeit der Anreicherung und Vermehrung der Salmonellen in den Schlammstoffen,die sich auf dem Boden der Aquarien bildeten.

b) Infektion der Fische

Es ist bekannt, daß die Darmbakterienflora der Fische bestimmt ist durch das die Fische umgebende Wasser, d.h. die Fische beherbergen in ihrem Darm diejenigen Bakterien, die in dem Wasser, in dem die Tiere leben, enthalten sind.

So war also auch zu erwarten, daß die Fische, wenn Salmonellen in dem Wasser, in dem sie leben, enthalten sind, diese aufnehmen.

Betrachtet man nun nochmals die Tatsache, daß in den Verdünnungsreihen von Wasser des zweiten Aquarium vom 12. Tag an zunächst kein Salmonella-Nachweis mehr gelang und in den Verdünnungsreihen des dritten Aquarium vom 23. Tag an keine Salmonellen mehr auffindbar waren, und zieht man die Ergebnisse der Tabelle S.43-45 hinzu, so ergibt sich, daß am 45. Tag nach der Infektion der Becken der letzte Salmonella-Nachweis in Fischen aus dem dritten Aquarium gelingt und daß aus Fischen aus dem zweiten Aquarium noch bis zum 318. Tag positive Untersuchungsergebnisse gewonnen werden.

Nun können die Fische im dritten Aquarium nur solange Salmonellen aufgenommen haben, wie die Bakterien im Wasser des Aquarium nachgewiesen wurden, d.h. also bis zum 23. Tag nach der Infektion. Demgegenüber ergibt sich für das zweite Aquarium eine andere Kette, und zwar: Infektion des Wassers mit der 24 h Bouillon von S. anatum-Aufnahme der Bakterien durch die Fische -Reinfektion des Wassers,

erkenntlich durch die positiven Ergebnisse der Membranfiltration von Aquariumwasser - erneute Aufnahme der Bakterien durch die Fische.

Betrachtet man nun nochmals die Untersuchungsergebnisse S.43-45,so fällt eine ausgesprochene Häufung der positiven Resultate bei der Untersuchung von Darm und inneren Organen der getöteten Fische auf.Kopf mit Kiemenregion und Fischrumpf (Muskulatur,Haut usw.) zeigen demgegenüber viel seltener positive Befunde.
Ein Teil der positiven Untersuchungsergebnisse vom Fischrumpf (Muskulatur,Haut usw.) könnte einmal durch mangelhafte Spülung der Fischoberfläche nach der Entnahme aus den Aquarien,zum anderen dadurch bedingt sein,daß Keime durch die Entnahme des Darmes und der inneren Organe von der inneren Leibeshöhle aus in die Muskulatur manipuliert wurden.

Versuch Nr. II

Auch im Versuch Nr.II werden,nachdem in den Verdünnungsreihen keine Salmonellen mehr nachgewiesen werden konnten,durch die Filtration von Aquariumwasser über einen längeren Zeitraum positive Untersuchungsergebnisse erhalten.
Ebenso wie in dem ersten Versuch (s. Kurve S. 40) fällt auch bei der graphischen Darstellung der Untersuchungsergebnisse aus den Verdünnungsreihen

wieder der steile Titerabfall auf (Kurve S.47), der auch hier von einem Anstieg und dann Wiederabfall gefolgt ist.Auf die Ursachen,durch die diese Titerschwankungen ausgelöst sein könnten, wurde bei der Besprechung des ersten Versuches eingegangen.

Versuch Nr.III

Die Isolierung der S. anatum aus der Mischkultur, die sich bei der Überimpfung des Kotfadens ergab, kann wohl als Bestätigung dessen angesehen werden, daß die Fische enteral infiziert wurden.
Der schon im Versuch Nr. I aus der Tabelle S.43-45 gewonnene Eindruck der Häufung der positiven Untersuchungsergebnisse aus dem Darm und den inneren Organen der Fische hat sich also auch im zweiten und dritten Versuch bestätigt und konzentriert sich auf den Fischdarm.Demgegenüber sind die Resultate aus Kiemen,Fischrumpf usw. seltener positiv.

In allen Versuchen,in denen die in den mit Bakterien aus der Salmonella-Gruppe infizierten Aquarien lebenden Fische untersucht wurden,konnte festgestellt werden,daß die Bakterien aus den Fischen viel länger gezüchtet wurden,als ihr Nachweis im Wasser mit der Membranfiltrationsmethode gelang. Mit 22 Tagen vom letzten Nachweis der Keime im Aquariumwasser bis zum letzten Auffinden der Bak-

terien in den Fischen hat das dritte Aquarium vom Versuch Nr. I die kleinste Spanne des ausschließlichen Nachweises der Salmonellen in den Fischen. In den anderen beiden Fällen liegt die Spanne wesentlich höher, selbst wenn man im zweiten Aquarium von Versuch Nr. I eine Reinfektion des Wassers in Betracht zieht.
Nimmt man an, daß die aufgenommenen Keime mit der gleichen Geschwindigkeit den Magen-Darm-Traktus der Fische durchwandern wie etwa die aufgenommene Nahrung oder verschlucktes Wasser, ohne also irgendwo im Fischkörper zu haften, so wären für dieses Durchwandern des Verdauungstraktes 22 Tage ganz entschieden eine zu lange Zeit.
Die Bakterien müssen also in den Fischleib gelangt, dort bleiben, sich vielleicht sogar vermehren und erst nach und nach wieder abgegeben werden. Käme es nun neben der enteralen Aufnahme der Bakterien noch zu einem Eindringen der Keime in die Lymphbahnen der Tiere, so wären hierdurch die Salmonellafunde in der Muskulatur und anderen Teilen der Fische zu erklären.
Wie weit die Versuchsergebnisse zu diesem Schluß berechtigen, kann nicht beantwortet werden; die Lebenszeit der Salmonellen in Warmwasserfischen schwankt jedenfalls zwischen 22 und 318 Tagen.

Die Bedenken einiger Autoren (SCHÄPERKLAUS (18) und FLOYD und JONES (6)) gegen das zu große Impfmaterial, mit dem die Fische in den Versuchen von

BRUNNER (4) infiziert wurden, werden geteilt. Die Ergebnisse, die hier von der Autorin an Kaltwasserfischen gewonnen wurden, konnten in den beschriebenen Versuchen auch für Warmwasserfische in dem Punkt bestätigt werden, daß sich die Keime noch nach längerer Zeit aus den Organen der Fische züchten ließen. Damit können Aussagen über die Lebenszeit der Keime in den Fischen gemacht werden.

Eine erneute Zufuhr von Bakterien zu dem Aquariumwasser könnte, wenn sie genügend groß ist, dazu führen, daß die Fische ständig die entsprechenden Keime enthielten.

Hier ergibt sich nun wieder die Parallele zum Fischmehl. Durch die Zuleitung von menschlichen und sonstigen Abwässern, die ja in den Herkunftsländern dieser Ware oft keine biologische oder chemische Reinigung erfahren, in die Flüsse und dem wie erwähnt außerordentlich hohen Durchseuchungsgrad der dort lebenden Bevölkerung ist eine ständige Zufuhr von Salmonellen in das Flußwasser gegeben.- Es ist bekannt, daß in den Ländern mit einer besonders hohen Zahl von Salmonella-Nachweisen in dem gelieferten Fischmehl das Ausgangsmaterial in den Flüssen, bzw. ganz in Küstennähe gefangen wird. Ferner ist erwiesen, daß die Fischmehle aus nordischen Ländern wie etwa Norwegen, die das Rohmaterial im Hochseefang gewinnen, weitgehend salmonellafrei sind.

Zusammenfassung

Einleitend werden die bakteriologischen Eigenschaften der Salmonella-Bakterien und ihre Epidemiologie beschrieben.
Auf die engen Beziehungen zwischen Salmonellafunden in Futtermitteln,unter besonderer Berücksichtigung des Fischmehles,und den Salmonellosen bei Mensch und Tier wird hingewiesen und diskutiert,auf welche Weise die Infektion der Futtermittel zustande kommen könnte.
Zur Klärung der Frage,ob beim Fischmehl eine primäre Infektion des Ausgangsmaterials,d.h. der Fische anzunehmen ist,wurden Versuche über die Lebenszeit der Salmonella-Bakterien in Warmwasserfischen angestellt.
Mehrere Aquarien mit unterschiedlichen Lebensbedingungen für Fische wurden eingerichtet.Infektionsversuche am Guppy (Lebistes reticulatus) sollten die Frage klären,wie lange Salmonella-Bakterien nach einer einmaligen Infektion in den Fischen selbst und in den betreffenden Aquarien nachgewiesen werden können.Die Frage,in welchen Organen der Fische die Bakterien haften oder sich anreichern,wurde an Goldfischen (Carassius carassius aureatus) untersucht.
Zur Infektion des Aquariumwassers und der Fische diente S.anatum ,ein Keim aus der E_1-Gruppe mit der Antigenformel 3,10:e,h:1,6.
In Verdünnungsreihen und mit Hilfe einer kombi-

nierten Membranfilter-Anreicherungsmethode konnten die Salmonellen im Wasser der einzelnen Aquarien verschieden lange nachgewiesen werden, spätestens noch 356 Tage nach der Infektion.
Auch in den Fischen sind die Salmonella-Bakterien verschieden lange nachweisbar. Der längste Zeitabstand von der Infektion, an dem ein Salmonella-Nachweis gelang, betrug 318 Tage.

Am häufigsten ließen sich Salmonella-Bakterien im Darm der untersuchten Tiere nachweisen.

Schrifttum

(1) ADAM,W. Berl. Münch.tierärztl. Wschr. 70, S.49, (1957)

(2) BISCHHOFF,J. Berl. Münch.tierärztl. Wschr. 69, S.293, (1956)

(3) BRODHAGE,H. Schweiz. med. Wschr. 27, S.962, (1963)

(4) BRUNNER,G. Vom Wasser Verlag Chemie, Weinheim S. 9, (1949)

(5) VOR DEM ESCHE und HANDLOSER Z. Hyg. Infekt. Kr. 145, S.304, (1958)

(6) FLOYD und JONES Amer. J. trop. med. 3, S.475, (1954)

(7) FROMME Ergebn. Mikrobiol. 32, S.161, (1959)

(8) HAMMER,D. Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 74, S.64, (1961)

(9) HOFMANN,S. ROHDE SEELIGER Bundesgesundheitsblatt 23, S. 361, (1963)

(10) KAUKER,E. Arch. Lebensmitt.-Hyg. 5, S.217, (1954)

(11) LUDORFF,W. Grundlagen und Fortschritte der Lebensmitteluntersuchung 6.

(12) MESSERLI,W. Schweiz. Arch. Tierheilk. 104, S.294, (1962)

(13) PETZELT,K. und STEINIGER.F. Arch. Hyg. (Berl.) 145, S. 605, (1961)

(14) EXPLOH und RAINER Gesundheitsfürsorge 5, S. 213, (1955)

(15) ROHDE und ADAM Zbl. Bakt. I.Abt. Orig. 166, S.329, (1956)

(16) ROHDE und BISCHHOFF Zbl. Bakt. I.Abt. Ref. 159, S. 145 , (1956)

(17) SCHAAL,E. Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 74, S. 21, (1961)

(18) SCHÄPERKLAUS Fischkrankheiten Akademie-Verlag, Berlin 3. Auflage

(19) SCHMIDT,B. und LENK,V. Zbl. Bakt. I.Abt. Orig. 178, S. 459, (1960)

(20) SEELIGER Zbl. Bakt. I.Abt. Orig. 174, S.327, (1959)

(21) SEELIGER HOFMANN ROHDE Zbl. Bakt. I.Abt. Orig. 182, S.357, (1961)

(22) STEINIGER,F. Acta path. microbiol. scand. 33, S. 401, (1953)

(23) STEINIGER,F. Der praktische Desinfektor 9, (1953)

(24) Statistisches Jahrbuch der UN Abteilung 71 (1961)

Gesetze und Verordnungen

(25) Verordnung zum Schutze gegen Infektionen durch Erreger der Salmonella-Gruppe in Eiprodukten vom 17.Dezember 1956
Bundesgesetzblatt Jahrgang 1956 Teil I

(26) Viehseuchenpolizeiliche Anordnung über die Ein- und Durchfuhr von Futtermitteln tierischer Herkunft aus dem Ausland.
Gesetz- und Verordnungsblatt für Berlin
13. Jahrgang Nr. 8 , 7.Febr. 1959
S. 161 - 162

Für die Überlassung des Themas der Dissertation möchte ich Herrn Professor Dr. med. H. Raettig und für die liebenswürdige Unterstützung bei den Experimenten und der Abfassung der Arbeit Herrn Dr. med. S. Hofmann vielmals danken.

Lebenslauf

Am 1. Oktober 1939 wurde ich in Berlin-Charlottenburg als Sohn des Studienrats Rudi John und seiner Ehefrau Herta, geb. Kosch, geboren. Am 28. März 1942 fiel mein Vater in St. Nazaire als Oberleutnant der Marine-Artillerie.

Am 15. Oktober 1945 wurde ich eingeschult, nachdem ich am 1. Oktober 6 Jahre alt geworden war. Ich besuchte 6 Jahre lang die II. Volksschule in Berlin-Tempelhof und dann von 1951 an den sprachlichen Zug der Askanischen Schule, Tempelhof, der den Erwerb des großen Latinums einschloß.

Ostern 1958 verließ ich mit bestandenem Abitur diese Schule.

Ich bewarb mich an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität, Berlin und wurde am 28. April 1958 immatrikuliert.

Die naturwissenschaftliche Vorprüfung legte ich 1959 ab und bestand nach 3 weiteren Studiensemestern 1960 die ärztliche Vorprüfung. - Am 15. März 1964 meldete ich mich an der Freien Universität, Berlin zur ärztlichen Prüfung und bestand am 20. Oktober 1964 das Staatsexamen mit der Note gut.

Seit dem 1. Februar 1965 arbeite ich als Medizinalassistent auf der internen Abteilung des Städt. Wenckebach-Krankenhauses, Berlin.

Rolf-Dieter John